

Élettani változások neminvazívan lélegeztetett krónikus obstruktív tüdőbetegekben és a dohányfüst sejtszintű hatásai

Doktori tézisek

Dr.Lukácsovits József

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Müller Veronika egyetemi docens, Ph.D

Hivatalos bírálók: Dr. Vizi Éva oszt. vez. főorvos, Ph.D.

Dr. Sziksz Erna tudományos munkatárs, Ph.D

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Cserhádi Endre emeritus egyetemi tanár, az
MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Somfay Attila egyetemi tanár, Ph.D

Dr. Varga János oszt. vez. főorvos, Ph.D

Dr. Orosz Zsuzsanna egyetemi adjunktus, Ph.D

Budapest

2013

1. Bevezetés

A dohányzás számos halálos betegség hátterében, kóroki tényezőként szerepel, évente kb. 5 millió ember hal meg a dohányzás miatt kialakuló betegségek következtében. A dohányosok átlagosan több mint 10 évet veszítenek életükből és ezen megrövidült életidejük utolsó éveiben a nem dohányzó populációnál jelentősen rosszabb az életminőségük. A XX-ik században kb. 100 millió ember halálát okozta a dohányzás, jelenleg a felnőtt lakosság kb. harmada dohányzik. A dohányzásnak bizonyított etiológiai szerepe van több szervrendszer daganatos és nem daganatos betegségének kialakulásában. A dohányzás okozta, egyik leggyakoribb, a tüdőt érintő megbetegedés a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD). A COPD egy olyan kórállapot melyet nem teljesen reverzibilis áramláskorlátozottság jellemez, mely általában progresszív és a tüdők krónikus gyulladásos reakciójával kapcsolatos, melyet toxikus részecskék vagy gázok krónikus inhalációja vált ki. A dohányfüst tüdőszövetet károsító sejtszintű mechanizmusai máig sem tisztázottak teljesen. Az emphysema illetve a COPD kialakulásában a dohányfüst által indukált sejt apoptosis és necrosis valamint a glucocorticoidok és a sejtek hősokk fehérje (HSP) rendszerének szerepe ezen folyamatokban intenzív kutatások tárgyát képezik napjainkban. A dohányzás okozta sejt károsodás, sejt stressz, hosszú távon a tüdő szöveti átalakulását (remodellingjét) provokálva, a tüdő makroszkópos elváltozását okozza, ezáltal mechanikai tulajdonságait negatív irányban megváltoztatja. A COPD előrehaladott stádiumában a csökkent tüdőfelület és a súlyos ventiláció/perfúzió inhomogenitás krónikus globális légzési elégtelenség kialakulásához vezethet. Ebben a kórállapotban alkalmazott tartós

neminvazív gépi lélegeztetés bizonyítottan javítja a betegek életminőségét és csökkenti a hospitalizációk számát, viszont a hosszú távú túlélésre gyakorolt hatásra nincs egyértelmű bizonyíték. A különböző lélegeztetési módok során fellépő fiziológiai változások felderítése fontos, mivel meghatározó szerepük lehet a betegek hosszú távú túlélésében.

2. Célkitűzések

1. A Hi-NPPV légzési mintázatra gyakorolt rövidtávú hatásainak vizsgálata.
2. A Hi-NPPV légzőizom mechanikára gyakorolt rövid távú hatásainak a meghatározása.
3. A Hi-NPPV vérgáz paraméterekre és beteg toleranciára gyakorolt rövidtávú hatásainak vizsgálata
4. A Hi-NPPV haemodinamikára gyakorolt rövid távú hatásainak a tisztázása.

**

5. Stabil minőségű dohányfüst extraktum (DFK) előállítása.
6. DFK alveoláris epithelsejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata.
7. DFK és glükocorticoid alveoláris epithelsejtekre gyakorolt együttes hatásának vizsgálata.
8. A HSP72 szerepének vizsgálata a DFK és dexamethasone (DEX) alveoláris epithelsejtekre gyakorolt együttes hatás során.

3. Módszerek

3.1. Élettani változások neminvazívan lélegeztetett krónikus obstruktív tüdőbetegekben

Összesen 15 beteget vizsgáltunk, melyek COPD talaján kialakult krónikus hyperkapniás légzési elégtelenség miatt kerültek kórházi felvételre, légzési rehabilitáció, illetve otthoni neminvazív lélegeztetés beállítása céljából. A vizsgálat idején mindegyik beteg klinikailag és haemodinamikailag stabil állapotban volt. A bevásztási kritérium a krónikus hypercapniás légzési elégtelenség fennállása volt ($\text{pH} > 7.35$, $\text{PaCO}_2 > 50$ Hgmm), kizárásra kerültek viszont a neuromuszkuláris betegségben, súlyos szívelégtelenségben és bármilyen malignus betegségben szenvedő betegek. Minden bevont beteg írásos beleegyezését adta a vizsgálathoz, melyet a helyi etikai bizottság engedélyezett.

A betegeket fél ülő helyzetben vizsgáltuk, neminvazív lélegeztetésüket 1 órával a vizsgálat előtt leállítottuk. A kiindulási élettani paramétereket egy 5 perces spontán légzés (SL) alatt rögzítettük minden vizsgálat legelején. Ezt kövően két különböző, randomizált sorrendben alkalmazott neminvazív gépi lélegeztetési beállítással lélegeztettük a betegeket 30-30 percig, 10 perc SL szünettel a két gépi lélegeztetés között. Mindegyik 30 perces lélegeztetési periódus legutolsó 5 percében rögzítettük a beteg élettani paramétereit. A betegeket, neminvazív lélegeztetőgéppel lélegeztettük, minden egyes beteg arcára adaptált arcmaszkon keresztül.

Két különböző beállítású neminvazív gépi lélegeztetést alkalmaztunk, az úgynevezett „alacsony intenzitású” (Li-NPPV) és „magas intenzitású” neminvazív lélegeztetést (Hi-NPPV). A Li-NPPV alatt 17.7 ± 1.6 H₂Ocm

belégzési nyomást (IPAP), 4 H₂Ocm kilégzési végnyomást (EPAP) és 12/perc légzési frekvenciát alkalmaztunk. W. Windisch és kutatótársai kidolgoztak egy új lélegeztetési beállítást, melyet magas intenzitású neminvazív lélegeztetésnek neveztek el. Ennek a gépi beállításnak a célja az artériás PaCO₂ maximális csökkentése, a belégzési nyomás fokozatos, a beteg által még tolerálható szintig való emelése által.

A Hi-NPPV során az volt a célunk, hogy az IPAP fokozatos emelésével (0,5 H₂Ocm/perc) elérjük a beteg által még tolerált maximális belégzési nyomást, mely legalább 50%-al magasabb, mint a Li-NPPV során alkalmazott érték. Az ily módon beállított értékekkel sikerült jól megközelítenünk más munkacsoportok által alkalmazott átlagos belégzési nyomásértékeket. A Hi-NPPV alatt 27.6 ± 2.1 H₂Ocm IPAP és 4 H₂Ocm EPAP értéket valamint 20-22/perc légzési frekvenciát alkalmaztunk. Ezzel a beállítással egy kontrollált vagy ahhoz közeli lélegeztetési mód elérése volt a célunk.

Vérgáz vizsgálat történt artéria radiálisból nyert artériás vérből, spontán légzés és mindkét beállítású neminvazív lélegeztetés során. A légúti áramlást fűtött pneumotachograph-hoz kapcsolt differenciál nyomásszenzorral mértük. A pneumotachographot közvetlenül a neminvazív lélegeztetőgép légző köre és az arcmaszk közé helyeztük. A légzési térfogatot a légúti áramlás görbe integrálásával számoltuk ki. A légzési mintázat ugyancsak az áramlágörbe alapján került meghatározásra. Az adatfeldolgozásnál a kilégzési légzéstérfogat értéket használtuk. A lélegeztető maszk melletti résveszteség a belégzési és kilégzési légzéstérfogatok különbségéből került meghatározásra.

A légúti nyomást az áramlásszenzor és arcmaszk közötti szakaszon kialakított elágazáson mértük. A beteg nyelőcsövén át két ballonkatéter lett vezetve, az egyik az oesophagus alsó harmadába, a másik a gyomorba,

ezen a két katéteren keresztül mértük és regisztráltuk az oesophagealis és gastrikus nyomásokat, melyek megfelelnek a pleurális (Ppl) ill. abdominális nyomásnak (Pab). A transzdiafragmatikus (Pdi) nyomás az abdominális és pleurális nyomás különbségeként lett meghatározva.

A diafragmatikus nyomás idő szorzat (PTPdi) a légzőizmok erő kifejtésének és oxigén felhasználásának jó indikátora. A PTPdi-t a Pdi görbe integrálásával határoztuk meg légzési ciklusra (PTPdi/légzési ciklus) és percre (PTPdi/perc) vonatkoztatva. A Pdi görbéből meghatároztuk továbbá a dinamikus intrinzik PEEP-et (PEEPi,dyn), mely a zéró légúti áramlási pontban mért Pdi értékkel egyenlő. Az ineffektív légzési erő kifejtéseket ugyancsak a Pdi görbéből határoztuk meg és az összes légzési ciklus százalékában tüntettük fel.

Vizsgálatunk során a Finometer Pro (Finapres Medical Systems BV, Amsterdam, the Netherlands) neminvaszív eszközzel regisztráltuk a betegek kardiovaszkuláris paramétereit. Az eszköz folyamatosan mérte a beteg vérnyomását és szívfrekvenciáját (HR), majd ezekből pulzuskontúr analízissel meghatározta a pulzustérfogatot (SV) és a keringési perctérfogatot (CO). A betegek a dyspnoe mértékét a Borg-skálán (0 -10-es skálán) határoztuk meg, spontán légzés, valamint mindkét típusú gépi lélegeztetés alatt.

Az adatok átlag \pm SD formátumban lettek feltüntetve. A mért változókat ANOVA-val majd ezt követő Newman-Keuls post hoc teszttel hasonlítottuk össze. Minden egyes adatsort normalitási vizsgálatnak vetettük alá, amennyiben a normalitási feltételek nem álltak fenn, akkor Friedmann tesztet alkalmaztunk. Az esetlegesen fennálló “carry-over” effektus kizárására Gizzle és Hills ajánlásai szerinti tesztet hajtottuk végre. Mindegyik teszt kétutas volt, a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

3.2. A dohányfüst sejtszintű hatásai

A549-es típusú immortalizált alveoláris II. epithelsejt vonalon végeztük kísérleteinket. A sejteket „Dubecco’s modified Eagle’s medium”-ot (DMEM) glükózt, főtális bovin szérumot, antibiotikumot/antimikotikumot, valamint L-glutamint tartalmazó tápoldatban, 5%-os széndioxid tartalmú párasított gázatmoszférában, 37 °C –on tenyésztettük.

„Dohányzó géppel” állítottuk elő a DFK-t a következő módon: 2 szál kereskedelembe kapható cigarettát használtuk el, a meggyújtott cigaretta füstjét 35 ml-es frakciókban 2 másodperc alatt átbuborékolattunk 16 ml 37 °C-s szérummentes médiumon. Két „szippantás” között 28 s szünetidőt iktattunk be, a ciklusokat mindaddig folytattuk, míg a 2 cigaretta el nem fogyott (egy átlagos dohányzási mintázatot szimulálva). Az elkészült DFK stabilitását tömegspektrométerrel vizsgáltuk és megfelelőnek találtuk kísérleteinkhez. Az elkészült DFK-t minden esetben fél órán belül felhasználtuk.

A kezelésekhez a sejteket 6 lyukú plate-en tenyésztettük 2 ml médiumban. DFK-t önmagában és/vagy dexamethasone-t (DEX) 3 különböző koncentrációkban (0.1; 1.0; 10.0 μ M) adagoltunk a médiumhoz. A DEX mentes csoport kontrollként szolgált. A sejteket az adott kezelések mellett 24 óráig tovább inkubáltuk 37°C-on párasított, 5% CO₂ tartalmú atmoszférában.

Az abszolút sejtszámot Cell-Dyn 3200-as automatával határoztuk meg az inkubációs szakasz leteltével készült sejtszuszpenzióból. Az apoptotikus és nekrotikus sejtek arányát áramláscytométerrel (FACSAria cytometer) határoztuk meg annexinV/propidium-jodid kettős festéssel. Az indukálható

HSP72 expresszáló sejteket valamint az expresszió intenzitást, anti HSP72 IgG, majd fluoreszcensen jelzett anti IgG festést követően ugyancsak FACS vizsgálattal határoztuk meg.

A sejttenyészetek RNS tartalmát izoláltuk, majd reverz transzkripcióval cDNS-t állítottunk elő, SuperScript II RNase-H kittel. Az így létrejött cDNS-t felhasználva, megfelelő primerek (HSP72 és GADPH) hozzáadása után, valós idejű PCR alkalmazásával (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) meghatároztuk a HSP72 és a gliceraldehid-3-foszfát (GADPH) mRNS expressziót, illetve ezek arányát.

A HSP72 csendesítő mRNS (siRNS) transzfekciót Neo FX™ transzfekciós tesztel végeztük. Kontrollként ál csendesítő HSP72 mRNS (scr-RNS) transzfekciót alkalmaztunk. 24 óra inkubáció után a transzfektált sejtkultúrákat DFK-val ill. DFK+DEX (10 μ M/ μ l) kezelésnek vetettük alá, kezelésmentes kontroll mellett. További 24 órai inkubációt követően ezekből a sejttenyészetekből is meghatároztuk az apoptózis arányt, HSP pozitív sejtarányt valamint HSP mRNS és HSP72 fehérje expressziót.

A mért adatokat átlag \pm SD (standard deviation) formátumban kerültek feltüntetésre. Shapiro-Wilk's tesztel történt normalitás vizsgálat után t-tesztet ill. vagy Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk az egyes csoportok összehasonlítására. $p < 0.05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. Eredmények

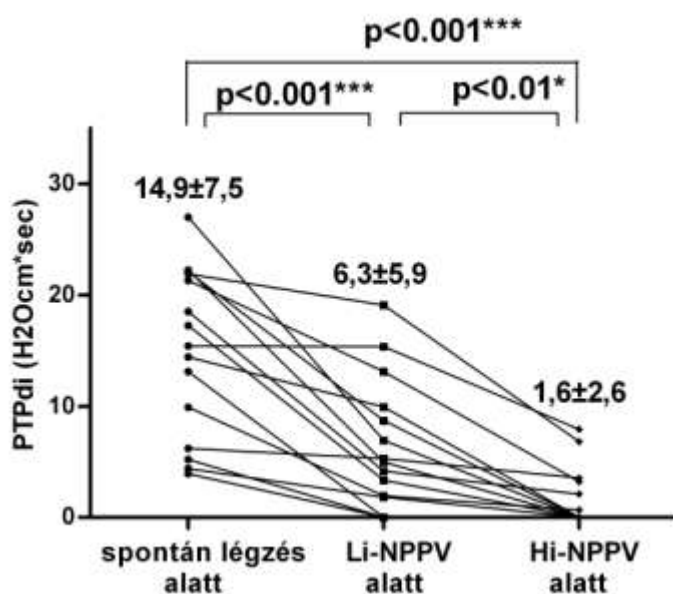
4.1. Élettani változások neminvazívan lélegeztetett krónikus obstruktív tüdőbetegekben

Mindegyik beválasztott betegnél végre tudtuk hajtani a vizsgálati protokollt, melyet mindannyian jól toleráltak. A 15 beválasztott betegből 8 abba a csoportba került, melynél elsőként Li-NPPV-t alkalmaztunk. A kiindulási értékekhez képest úgy a Hi-NPPV, mint a Li-NPPV megemelték a lézési térfogatot és percventillációt (SL: 9.6 ± 3.5 l ; Li-NPPV: 11.7 ± 2.3 l ; Hi-NPPV 15.2 ± 2.0 l; SL vs. Li-NPPV $p < 0.01$; SL vs. Hi-NPPV $p < 0.001$; Li-NPPV vs. Hi-NPPV $p < 0.001$) de ezek a változások szignifikánsan magasabbak voltak a Hi-NPPV alkalmazása során.

A réslevegő mennyiségét a hagyományos gépi beállítás során alacsonyabbnak találtuk (Li-NPPV: 10.62 ± 5.27 l/perc vs. Hi-NPPV 16.11 ± 7.88 l/perc; $p < 0.05$). Az átlagos belégzési áramlás magasabb volt a Hi-NPPV alatt (Li-NPPV: 0.52 ± 0.11 l/s vs. Hi-NPPV 0.93 ± 0.18 l/s $p < 0.05$) az aktív belégzési arányt (Ti/Ttot) pedig alacsonyabbnak találtuk ebben a beállításban (Li-NPPV: 0.37 ± 0.08 vs. Hi-NPPV 0.27 ± 0.05 $p < 0.001$), viszont a légzési frekvenciát illetően nem igazoltunk jelentős eltérést.

A transzdiaphragmatikus nyomás amplitúdója valamint a diaphragmatikus nyomás-idő szorzat egy légvételre (PTPdi/légvétel) illetve egy percre (PTPdi/perc) vonatkoztatott értékei csökkenést mutattak a spontán légzéshez viszonyítva mindkét lélegeztetési módban, mely változás szignifikánsan magasabbnak bizonyult Hi-NPPV alkalmazása során (PTPdi/min: SL: 323 ± 149 H₂Ocm*s/min; Li-NPPV: 132 ± 139 ; Hi-NPPV 40 ± 69

H₂Ocm*s/min; SL vs. Li-NPPV $p<0.001$; SL vs. Hi-NPPV $p<0.001$; Li-NPPV vs. Hi-NPPV $p<0.01$) (1.ábra).

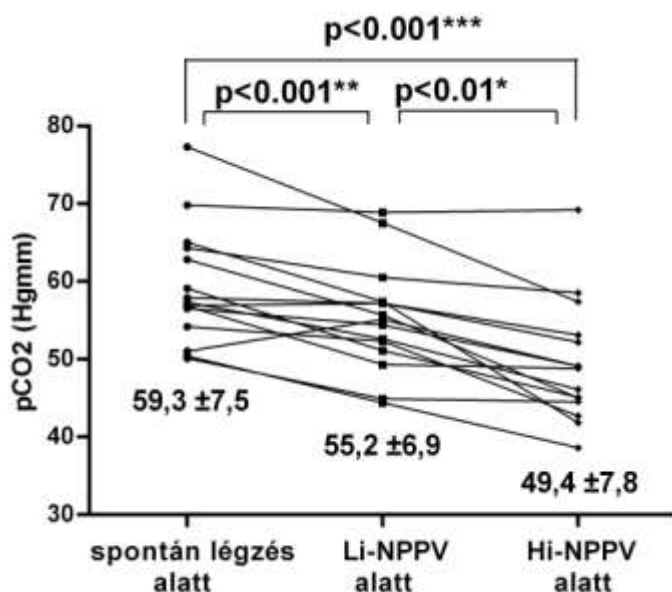


1. ábra: A diafragmatikus nyomás-idő szorzat (PTPdi/légvétel) értékei csökkenést mutattak a spontán légzéshez viszonyítva mindkét lélegeztetési módban, mely változás szignifikánsan magasabbnak bizonyult Hi-NPPV alkalmazása során.

A Hi-NPPV gépi beállítás alatt a 15 betegből 9-nél a Pdi görbe gyakorlatilag elsimult, a pleurális nyomás pedig pozitívvá vált, kontrollált lélegeztetés látszatát keltve. Hi-NPPV alatt, a Pdi görbe elsimulása miatt a PEEP_{i,dyn} nem volt kiszámítható. Neminvazív lélegeztetés alatt a tüdőellenállás csökkenését tapasztaltuk, viszont szignifikáns különbség nélkül a két lélegeztetési mód között.

Mindkét gépi lélegeztetési beállításban a pH és a PaCO₂ javulását figyeltük meg a spontán légzés alatti értékekhez viszonyítva, viszont ez a különbség szignifikánsan nagyobb volt Hi-NPPV beállítás alatt (PaCO₂: SL: 59.3±7.5 Hgmm; Li-NPPV: 55.2±6.9 Hgmm ; Hi-NPPV 49.4±7.8 Hgmm;

SL vs. Li-NPPV $p<0.001$; SL vs. Hi-NPPV $p<0.001$; Li-NPPV vs. Hi-NPPV $p<0.01$) (2. ábra).

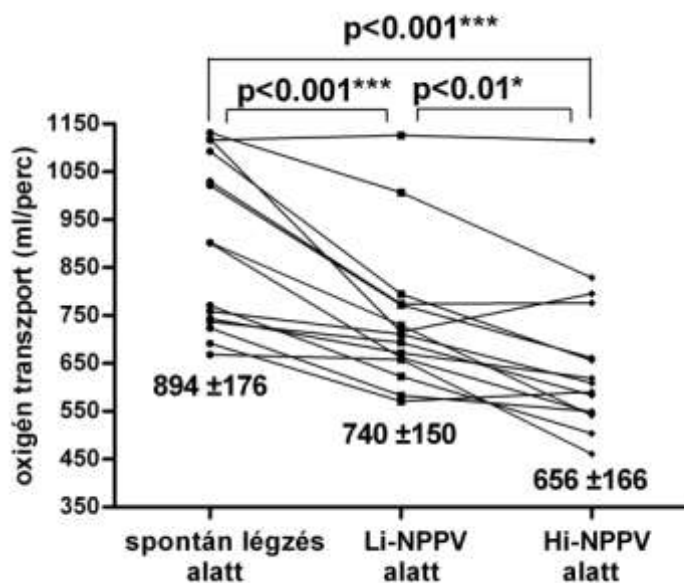


2. ábra: Mindkét gépi lélegeztetési beállításban a PaCO₂ javulását figyeltük meg a SL alatti értékekhez viszonyítva, viszont ez a különbség szignifikánsan nagyobb volt Hi-NPPV beállításban.

A Borg pontszám tekintetében szignifikáns javulást találtunk gépi lélegeztetés alatt spontán légzéshez viszonyítva, jelentős különbség nélkül a két gépi lélegeztetési mód között (6.93 ± 1.1 SL-ben; 3.13 ± 1.64 Li-NPPV-ben $p<0.001$; 4.67 ± 1.04 Hi-NPPV-ben $p<0.01$).

A gépi lélegeztetés szignifikánsan csökkentette a systoles artériás vérnyomást, különbség nélkül a Hi-NPPV és Li-NPPV lélegeztetés módok között. Mindkét NPPV során szignifikáns csökkenést észleltünk a pulzustérfogatban, a keringési perctérfogatban valamint ennek a testfelületre vetített értékében. Mindezen változásokat kifejezettebbnek találtuk a Hi-NPPV alatt a Li-NPPV-hez viszonyítva. A keringési perctérfogattal párhuzamosan, csökkent az artériás oxigén szaturációból és perctérfogatból

számított oxigénszállítás (DO_2) (3. ábra) és ennek a testfelületre vetített értéke (DO_2/m_2 : SL: 577 ± 110 ml/min/ m_2 ; Li-NPPV: 462 ± 93 ml/min/ m_2 ; Hi-NPPV 409 ± 104 ml/min/ m_2 ; SL vs. Li-NPPV $p < 0.001$; SL vs. Hi-NPPV $p < 0.001$; Li-NPPV vs. Hi-NPPV $p < 0.01$).



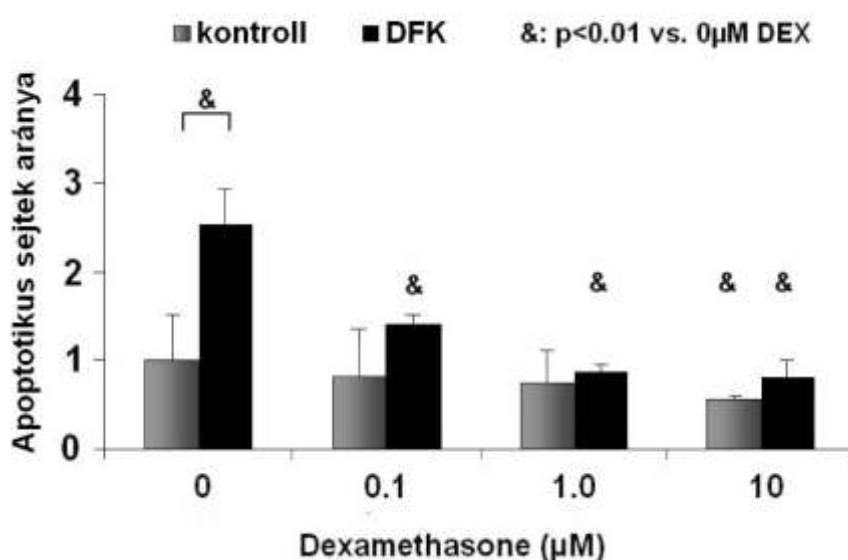
3. ábra: Csökkent a számított oxigénszállítás (DO_2) mindkét típusú NPPV alatt során spontán légzéshez viszonyítva, mely csökkenés kifejezettebb volt a Hi-NPPV alkalmazása során.

Szignifikáns összefüggést találtunk a perctérfogat nyugalmi értékhez viszonyított %-os változása ($\Delta CO\% = 100 * (CO_{Hi-NPPV} - CO_{SL}) / CO_{SL} \%$) valamint a pleurális nyomás nyugalmi értékhez képest mért abszolút változása ($\Delta Ppl = Ppl_{Hi-NPPV} - Ppl_{SL}$) között Hi-NPPV lélegeztetés alatt ($r = -0.68$, $p < 0.01$). Nem igazolódott összefüggés a bal kamrai ejekciós frakció és a perctérfogat nyugalmi értékhez viszonyított változása között.

4.2. A dohányfüst sejttani hatásai

A beállított paraméterek mellett a sejtek megfelelő proliferációját tapasztaltuk. DEX kezelést követően nem találtunk számottevő változást a sejtszámban, viszont a DFK kezelést követően a sejtszám szignifikánsan csökkent a kontroll sejtekhez képest. DFK+DEX együttes alkalmazásakor a sejtszám dózisfüggő (DEX) emelkedését tapasztaltuk a csak DFK-val kezelthez viszonyítva. Ez hatás a DEX(10) csoportokban volt a legkifejezettebb, amikor már nem találtunk szignifikáns különbséget a sejtszámokban (C+DEX (10): $10.22 \pm 0.77 \times 10^5$ cell/vial; DFK+DEX (10): $8.86 \pm 0.49 \times 10^5$ cell/vial).

A DEX önmagában enyhén csökkentette a sejtek apoptosist, de ez a csak a DEX(10) csoportban volt szignifikáns. A csak DFK-val kezelt sejtvonalon az apoptózis megháromszorozódott a kontrollhoz képest. DEX hozzáadása dózisfüggően csökkentette az apoptosist a DFK-val kezelt csoportokban (4. ábra).



4. ábra: A DEX önmagában csak a DEX(10) csoportban csökkentette szignifikánsan az apoptosist. A steroidmentes DFK kezelt sejtvonalon az

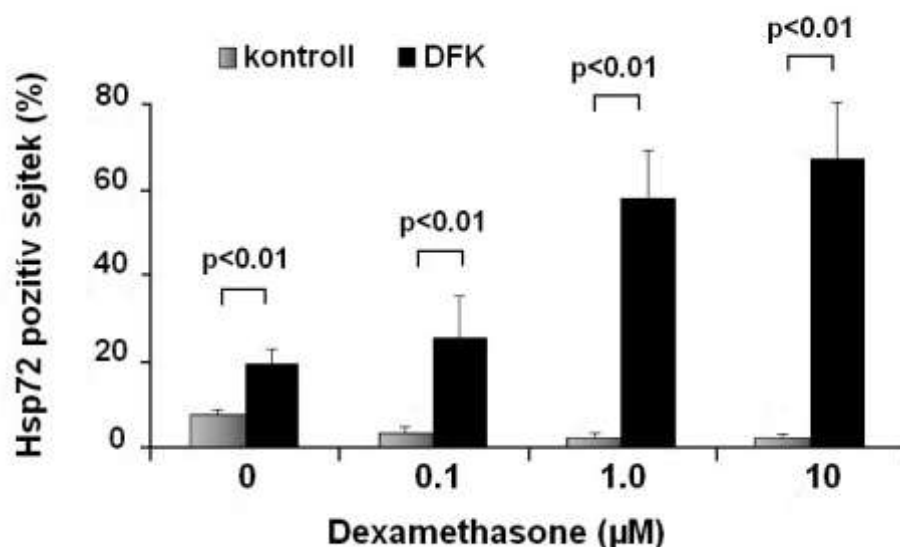
apoptózis megháromszorozódott. Dexamethasone hozzáadása mellett a DFK okozta apoptosis dózisfüggően szignifikánsan csökkent.

A nekrotikus sejtek arányát illetően nem volt különbség a kontroll és a steroid kezelt csoportok között. A DFK kezelés önmagában szignifikánsan növelte a sejtnekrózist. A DFK mellett alkalmazott dexamethasone nem volt befolyással a DFK okozta nekrózisra, így minden DFK+DEX csoportban szignifikánsan magasabb nekrotikus sejtarányt találtunk a kontroll sejtvonalhoz képest (DFK: $6.24 \pm 1.02\%$; DFK+DEX (0.1): $6.12 \pm 2.11\%$; DFK+DEX (1): $6.68 \pm 1.1\%$; DFK+DEX (10): $4.7 \pm 0.75\%$; $p < 0.05$ vs. kezelésmentes kontroll)

DEX kezelés önmagában nem változtatta meg a sejtek intracelluláris HSP72 mRNS expresszióját. Csak DFK-val kezelt sejtvonalon a kezeletlen kontrollhoz hasonló alacsony HSP72 mRNS expressziót találtunk. DFK mellett alkalmazott DEX szignifikánsan, dózisdependens módon emelte a sejteken belüli HSP72 mRNS expressziót már 0,1M dózissnál, míg a maximális hatást az 1.0 M-os koncentrációban tapasztaltuk (a DFK+DEX(10) csoportban nem volt további emelkedés a HSP72 mRNS expresszióban).

A kezelésmentes kontroll csoportban a HSP72 fehérjét expresszáló sejtek arányát és ezeken belüli HSP72 intenzitást alacsonynak találtuk. A DEX kezelés önmagában tovább csökkentette a HSP72-t expresszáló sejtek arányát és ezeken belüli HSP72 intenzitást. A DFK-val kezelt csoportokban a HSP72-t expresszáló sejtek aránya szignifikáns növekedést mutatott a kontroll csoportokhoz (tehát a kezelésmentes, ill. a különböző dózisu DEX kezelt) viszonyítva ($p < 0.01$).

A DFK mellett alkalmazott DEX kezelés szignifikánsan és dózisdependens módon emelte a HSP72 expresszáló sejtek arányát, a legnagyobb arányt a DFK+DEX(10) csoportban érven el (5 ábra).



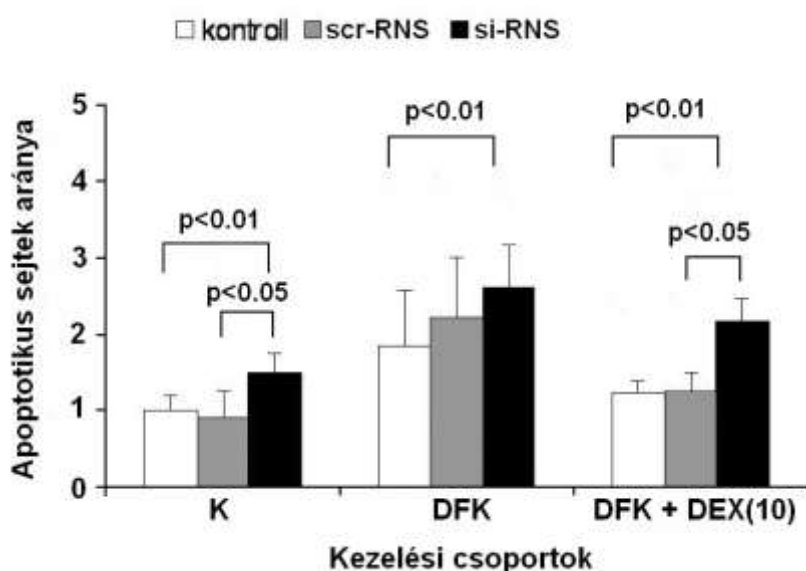
5. ábra: A DFK mellett alkalmazott DEX kezelés szignifikánsan és dózisdependens módon emelte a HSP72 expresszáló sejtek arányát.

A DFK alkalmazása önmagában, szignifikánsan emelte a a sentek HSP72 fehérje tartalmát („HSP72 intenzitást”) a HSP72 pozitív sejtekben a kezelés nélküli kontrollhoz viszonyítva ($p < 0.01$). DFK+DEX csoportokban, szignifikánsan, tovább nőtt a HSP72 intenzitás a HSP72-t expresszáló sejtekben, a kezelés nélküli kontrollhoz képest ($p < 0.01$).

Csenedesítő HSP72 mRNS-el (si-RNS) vizsgáltuk, hogy a DFK mellett alkalmazott DEX sejtvédő hatása összefüggésben áll-e a megemelkedett sejten belüli HSP72 expresszióval. Transfectios kísérleteink sikeresek voltak. Az ál csenedesítő HSP72 mRNS-el (scr-RNS) transzfektált, a DFK-val kezelt és a kontroll sejt vonalakon nem változott a HSP72 expresszió. Ezzel ellentétben az si-RNS-el transzfektált, DFK-val kezelt és kontroll

sejtkultúrákban a HSP72 szignifikáns (60-80%-os) csökkenését tapasztaltuk. A legmarkánsabb csökkenés a DFK+DEX(10) csoportban volt tapasztalható a sejteken belüli Hsp72 fehérje intenzitást illetően. A Hsp72-t expresszáló sejtek aránya szignifikánsan csökkent az siRNS transzekció után, míg a scr-RNS-el transzekált sejtvonalakon ez az arány nem változott.

Az apoptotikus sejtek arányát szignifikánsan magasabbnak találtuk párhuzamosan a sejteken belüli Hsp72 expresszió csökkenésével, mely bizonyítja, hogy direkt összefüggés van a Hsp72 szint és a sejtek programozott sejthalála között (6. ábra).



6. ábra: Hsp72 siRNS-el transzekált sejtvonalon az apoptotikus sejtek aránya szignifikánsan emelkedett DFK+DEX(10) kezelés mellett.

5. Következtetések

Hi-NPPV alatt:

1. Szignifikánsan nőtt a V_t és a percventilláció, valamint szignifikánsan csökkent az inspirációs idő és az aktív belégzési arány („duty cycle”).
2. Szignifikánsan nőtt a Pdi amplitúdó és drámaian csökkent a PTPdi.
3. Szignifikánsan javult az artériás pH és csökkent a PaCO_2 , párhuzamosan a dyspnoe pontszám jelentős csökkenésével.
4. Szignifikánsan csökkent a perctérfogat és az oxigén transzport.

**

5. A megépített „dohányzó géppel” stabil minőségű DFK-t sikerült előállítanunk.
6. A DFK alveoláris epithelsejt-tenyészetben szignifikánsan növelte a sejtpusztulást.
7. DFK és glucocorticoid együttes alkalmazásakor az apoptózis mértéke a DEX dóziséval arányosan csökkent és ezzel párhuzamosan nőtt a sejtek HSP72 tartalma.
8. Transfectios kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a DEX ezen sejtvédő hatásában kulcsszerepet játszik a HSP72.

6. Saját közlemények bibliográfiai adatai

Az értekezés témájában megjelent közlemények

Lukácsovits J, Carlucci A, Hill N, Ceriana P, Pisani L, Schreiber A, Pierucci P, Losonczy G, Nava S. (2012) Physiological changes during low and high "intensity" noninvasive ventilation. Eur Respir J, 39: 869-875.

IF: 5,895

Gál K, Cseh A, Szalay B, Rusai K, Vannay A, **Lukácsovits J**, Heemann U, Szabó AJ, Losonczy G, Tamási L, Müller V. (2011) Effect of cigarette smoke and dexamethasone on Hsp72 system of alveolar epithelial cells. Cell Stress Chaperones, 16: 369-378.

IF: 3,013

Egyéb közlemények

Lukácsovits J, Nava S. (2013) Inspiratory pressure during noninvasive ventilation in stable COPD: help the lungs, but do not forget the heart. Correspondence, From the authors. Eur Respir J, 41: 765-766.

IF: 5.895

Szondy K, Rusai K, Szabó AJ, Nagy A, Gal K, Fekete A, Kovats Z, Losonczy G, **Lukácsovits J**, Müller V. (2012) Tumor cell expression of heat shock protein (HSP) 72 is influenced by HSP72 [HSPA1B A(1267)G]

polymorphism and predicts survival in small Cell lung cancer (SCLC) patients. Cancer Invest, 30: 317-322.

IF: 1,847

Máthé C, Bohács A, Duffek L, **Lukácsovits J**, Komlosi ZI, Szondy K, Horváth I, Müller V, Losonczy G. (2011) Cisplatin nephrotoxicity aggravated by cardiovascular disease and diabetes in lung cancer patients. Eur Respir J, 37: 888-894.

IF: 5,895

Gál K, Cseh A, Szalay B, Rusai K, Vannay A, **Lukácsovits J**, Uwe H, Szabó AJ, Losonczy G, Tamási L, Kováts Z, Müller V. (2011) Dohányfüst és szteroid hatása tüdő-epithelsejtek hősokkfehérje (HSP) 72-rendszerére. Med Thor, 64: 152-160.

Máthé C, Bohács A, Duffek L, **Lukácsovits J**, Komlosi ZI, Szondy K, Horváth I, Müller V, Losonczy G. (2011) Cardiovascularis betegségben és diabetes mellitusban szenvedő tüdőcarcinomás betegekben fokozódik a cisplatin nephrotoxikus hatása. Med Thor, 64: 33-41.

Lukácsovits J, Komáromi T, Tamási L, Magyar P, Losonczy G. (2009) Kétoldali intersticiális pneumonia miatt gépi lélegeztetett beteg esetismertetése. Med Thor, 52: 137-139.

Lukácsovits J fordítása. (2009) A Sepsis legutóbbi 100 éve. Med Thor, 62: 266-277.

7. Köszönetnyilvánítások

Szeretném megköszönni a Semmelweis egyetem Pulmonológiai Klinika igazgatójának, egyben programvezetőmnek, Dr. Prof Losonczy Györgynek a segítségét és azt, hogy bevezetett, megszeretette velem a tudományos munkát, valamint, hogy hatékony szakmai és emberi segítséget nyújtott abban, hogy külföldi kutatóintézetbe kerülhessek és ott színvonalas kutatómunkát folytathassak az általam preferált témában.

Megköszönöm témavezetőmnek Dr. Müller Veronikának önzetlen munkáját, segítségét és azt, hogy felfedezte bennem a „kutatót”, kihívások elé állított, ezáltal elősegítve tudományos pályám kibontakozását.

Köszönetemet kell kifejezzem Dr. Magyar Pál[†] professzor úrnak, aki a kezdet kezdetén meglátta bennem a „szikrát”, döntése által lettem a S.E. Pulmonológiai Klinika alkalmazottja és pályafutásom kezdetén gondosan egyengette az utamat.

Hálával tartozom Dr. Prof Stefano Nava-nak és további olasz kollegáknak (Dr. Piero Ceriana, Dr. Annalisa Carlucci, Dr. Annia Schreiber, Dr. Nicolas Hill, Dr. Giuseppe Bunetti, Dr. Marco Mancini, Dr. Antonella Balestrino) akik, az Olaszországban töltött egy éves kutatómunkám során hasznos szakmai segítséget nyújtottak és emberileg is támogattak.